

# El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo

M. Martínez-Alonso, N. Gaju

Departamento de Genética y Microbiología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona. España.

En la actualidad, los vertidos accidentales de petróleo constituyen uno de los problemas medioambientales más preocupantes. Hace más de dos décadas que se empezó a actuar sobre los lugares afectados por este tipo de catástrofes. Entre los posibles tratamientos a aplicar para la descontaminación, merecen una especial atención los procesos de degradación biológica basados en la acción de los microorganismos sobre los productos contaminantes. Los tapetes microbianos son unos ecosistemas, ampliamente distribuidos en las zonas litorales, que se han mostrado como prometedores agentes para la biorremediación ya que, dadas sus características, agrupan, en un espacio de pocos milímetros, complejas poblaciones de microorganismos aerobios y anaerobios capaces de colonizar zonas altamente contaminadas. Una aproximación muy útil para evaluar tanto el impacto de una contaminación de estas características sobre la diversidad microbiana, como los procesos de biodegradación que pueden tener lugar en este tipo de comunidades, es reproducirlas de manera miniaturizada en el laboratorio. El verdadero valor de estos sistemas modelo o microcosmos, es que nos proporcionan un instrumento para comprender la función del ecosistema y los factores que controlan el flujo de energía y materia, permitiendo, por tanto, el desarrollo de una capacidad predictiva imprescindible a la hora de desarrollar estrategias útiles de biorremediación.

Nowadays, accidental oil spills constitute one of most worrying environmental problems. More than two decades ago, first *in situ* actions on the places affected by this type of catastrophes were started to be taken. Among the treatments that can be applied for the decontamination of polluted areas, biological degradation processes, based on the action of the microorganisms on polluting petroleum hydrocarbon components, deserve a special attention. Microbial mats are ecosystems, widely distributed along the shorelines, which have been considered as promising agents for bioremediation, because they group in a space of few millimetres complex populations of aerobic and anaerobic microorganisms able to colonize zones highly contaminated. A very useful approach for evaluating the impact of such a contamination event on the microbial diversity, and the biodegradation processes that take place in this type of communities, is to reproduce them in a laboratory scale. The true value of these model systems, called microcosm, is that they provide an instrument for understanding the function of the ecosystem and the factors that control the flow of energy and matter, allowing, therefore, the development of a predictive capacity, essential for developing useful strategies of bioremediation.

## Los vertidos de petróleo

Desde el último tercio del siglo XIX, el petróleo es la energía primaria más importante a nivel mundial. Prácticamente todas las actividades económicas se sustentan en el petróleo, de manera que alrededor del 40% de las necesidades energéticas mundiales son cubiertas con esta fuente de energía no renovable.

En la actualidad, uno de los problemas medioambientales más preocupantes son los vertidos de petróleo en el mar y la consecuente contaminación de la costa (**Fig. 1**). Éstos se producen como consecuencia de una combinación de diferentes acciones y circunstancias. En primer lugar nos encontramos con las diferentes operaciones que, de forma rutinaria, se llevan a cabo en los buques, tales como las operaciones de carga, descarga y almacenamiento del fuel. No obstante, el mayor impacto ocurre cuando se producen accidentes como fallos en el casco, encallado de los buques, incendios o colisiones.

En estos casos, los derrames aumentan dramáticamente hasta cientos de miles de toneladas, produciéndose las mareas negras y los desastres ecológicos, culturales y económicos tanto en el mar como en las zonas costeras que quedan arrasadas (Exxon Valdez (1989), Nakhodka (1997), Prestige (2002)).



**Figura 1.** Imagen de la costa gallega después del vertido de petróleo del Prestige en 2002. Fotografía cortesía de Ingrid Salazar.

El petróleo está compuesto por una mezcla de hidrocarburos que pueden agruparse en cuatro clases: saturados, aromáticos, asfaltenos y resinas (Colwell y Walker, 1977); los cuales, difieren respecto a su susceptibilidad frente a su posible biodegradación. Teniendo en cuenta que la composición del petróleo es altamente variable, el riesgo ambiental que suponen los vertidos de petróleo dependerá de la naturaleza y proporción de los diferentes componentes de éste. Así pues, las características físico-químicas del crudo y su persistencia y biodegradabilidad en un determinado ambiente son de gran interés para evaluar el posible impacto sobre el ecosistema de un determinado vertido.

El impacto ecológico de un vertido accidental de petróleo incluye efectos tanto a corto como a medio y largo plazo. Cuando tiene lugar un vertido de petróleo, éste puede ser dispersado y degradado de manera natural al cabo de varios años. Diversas investigaciones realizadas tras accidentes de estas características han puesto de manifiesto que la eliminación natural es muy lenta y los depósitos de petróleo permanecen durante muchos años; de manera que, la recuperación de los ecosistemas afectados puede llevar mucho tiempo. Este hecho ha determinado que, lo largo del tiempo, se hayan ido desarrollando numerosas estrategias con el objetivo de paliar los efectos de una contaminación por vertidos de petróleo y acelerar el proceso de recuperación de los ambientes dañados. Una posibilidad es usar una combinación de métodos físicos y químicos los cuales son especialmente útiles en situaciones graves; aunque, pueden ser procesos caros cuando la zona afectada es muy extensa. Otra alternativa es la utilización de métodos biológicos que implican la utilización de microorganismos, bacterias, hongos o levaduras, ya sean en cultivo axénico o en forma de consorcios. El término que se utiliza para definir este tipo de métodos es la biorremediación (Atlas., 1981; Korda et al., 1997; Swannell et al., 1996).

## Los microorganismos como agentes de biorremediación

La legislación y la tecnología orientada a la limpieza del ambiente y la prevención de su deterioro han sido dos de los mayores avances de finales del siglo XX y han propiciado el nacimiento de la tecnología de la biorremediación. Dicha técnica se basa en la existencia de microorganismos cuyo metabolismo es capaz de transformar los hidrocarburos, convirtiendo los componentes tóxicos y mutagénicos del petróleo en productos no tóxicos, los cuales pueden integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales.

El éxito de la técnica depende de la existencia, en el lugar contaminado, de microorganismos con las capacidades metabólicas apropiadas, concentraciones adecuadas de oxígeno y nutrientes, así como de las características del petróleo vertido (Leahy y Colwell, 1990).

Cuando es aplicable, la biorremediación suele ser un medio rentable para restablecer la calidad del medio ambiente. No obstante, y a pesar de la relativamente larga historia de la investigación en el campo de la biorremediación de vertidos de petróleo, ésta continúa siendo una disciplina esencialmente empírica, en la cual muchos de los factores biológicos que controlan los procesos no han sido adecuadamente comprendidos (Korda et al., 1997).

Los vertidos de petróleo tienen un profundo impacto sobre la estructura de las comunidades microbianas naturales, el cual se suele traducir en una reducción de la diversidad, la biomasa y la actividad (Macnaughton et al., 1999). Se ha visto que en los ambientes sometidos a una contaminación crónica tienden a predominar las poblaciones de microorganismos capaces de utilizar los compuestos contaminantes o con capacidad de sobrevivir en su presencia; pero que bajo condiciones normales dichos grupos de microorganismos están presentes a bajas concentraciones. La mayor parte de nuestro conocimiento sobre los efectos ecológicos derivados de un episodio de estas características proviene de los datos obtenidos a partir de microorganismos o consorcios, aislados a partir de dichos ambientes, con capacidad de degradar hidrocarburos o compuestos modelo (Kanaly et al., 2000; Rios-Hernández et al., 2003).

Desde los estudios pioneros de ZoBell (1946) en ambientes marinos, se han aislado numerosas cepas bacterianas de ambientes litorales y oceánicos capaces de degradar diferentes hidrocarburos (Atlas, 1981; Leahy y Colwell, 1990; Van Hamme et al., 2003; Watanabe, 2001). Muchas de estas bacterias, tales como *Alcalinivorax*, o *Planococcus*, usan un número limitado de fuentes de carbono, preferentemente utilizan hidrocarburos de petróleo, y podrían considerarse como especialistas (Dyksterhouse et al., 1995; Engelhardt et al., 2001; Golyshin et al., 2002; Yakimov et al., 1998 y 2003). No obstante, también se han aislado bacterias que no presentan esta marcada especialización, como *Marinobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Sphingomonas* o *Geobacillus* (Gauthier et al., 1992; Gilewicz et al., 1997; Maugeri et al., 2002; Zhuang et al., 2003).

El conocimiento de la diversidad microbiana es de importancia capital, tanto para evaluar el impacto que supone una perturbación de estas características, como para determinar qué poblaciones microbianas pueden estar implicadas en la biodegradación de los hidrocarburos. Las metodologías tradicionalmente utilizadas para el estudio de los procesos de biorremediación consistían en la utilización de métodos microbiológicos convencionales para la obtención de cultivos axénicos o consorcios con capacidad de degradar hidrocarburos. Sin embargo, desde hace tiempo se ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar métodos que no requieran un paso previo de cultivo, dado que una gran parte de los microorganismos presentes en los ambientes naturales no pueden crecer en medios de cultivo sintéticos (Amann et al., 1995). Las aproximaciones basadas en el análisis del RNA ribosómico, ya sea mediante la construcción de librerías genéticas, la hibridación *in situ* o la electroforesis en geles de gradiente desnaturante a partir de rDNA amplificado mediante PCR (PCR-DGGE) han revelado una enorme diversidad en los ambientes naturales (Amann et al., 1995; Olsen et al., 1986; Pace et al., 1986; Torsvik et al., 1998). Las bacterias obtenidas a partir de técnicas convencionales de cultivo suelen ser muy diferentes a las identificadas mediante aproximaciones cultivo-independientes; de hecho, muchas veces las bacterias aisladas en cultivo axénico representan una baja proporción de las poblaciones microbianas presentes en el ambiente natural (Eilers et al., 2000; Suzuki et al., 1997). Así pues, los métodos moleculares han permitido detectar numerosas bacterias no cultivables, algunas de las cuales constituyen poblaciones dominantes; también pueden proporcionar información sobre la función de las poblaciones microbianas, de una manera indirecta; y, finalmente, permiten proporcionar medidas para determinar la influencia de la polución y reforzar las prácticas de biorremediación basadas en la microbiota autóctona (White et al., 1998).

## Efecto de los factores ambientales sobre la biodegradación de hidrocarburos

Muchos de los ambientes marinos susceptibles de ser contaminados como consecuencia de los vertidos de petróleo pueden considerarse ambientes extremos, ya que se caracterizan por estar sometidos a condiciones ambientales extremas, tales como bajas o altas temperaturas, pH ácido o alcalino, concentraciones salinas elevadas y/o elevadas presiones. Por lo tanto, en estos casos, los microorganismos adaptados a crecer bajo estas condiciones juegan un papel importante en la biorrecuperación de los ambientes contaminados.

### Temperatura

La temperatura es un parámetro fundamental a considerar en la biorremediación *in situ*, ya que tanto la biodisponibilidad como la solubilidad de los compuestos más hidrofóbicos dependen de este parámetro. Un incremento de temperatura provoca un descenso de la viscosidad y, por tanto, afecta al grado de dispersión y al aumento de las tasas de difusión de los compuestos orgánicos. Además, las bajas temperaturas impiden la volatilización de alcanos de cadena corta ( $< C_{10}$ ), por lo que aumenta su solubilidad en la fase acuosa y su toxicidad, lo cual puede ralentizar el proceso de degradación.

En comparación con los ecosistemas mesofílicos, hay pocos ejemplos de biorremediación de lugares contaminados sometidos a bajas temperaturas. El umbral para una degradación significativa es de 0°C (Siron et al., 1995). Se han caracterizado diversos microorganismos adaptados a las bajas temperaturas, capaces de degradar hidrocarburos (Whyte et al., 1996, 1998; MacCormack y Fraile, 1997; Margesin y Schinner, 1999; Foght et al., 1999). De la misma manera, a temperaturas elevadas, como por ejemplo en las zonas litorales de regiones semiáridas, también se han encontrado microorganismos termófilos, que poseen un determinado potencial para la conversión de hidrocarburos (Müller et al., 1998; Chen y Taylor, 1995, 1997a, 1997b).

### pH

La mineralización de hidrocarburos se ve favorecida a pHs próximos a la neutralidad. En algunas bacterias heterótrofas acidófilas se ha demostrado la adquisición y expresión de genes que codifican enzimas implicados en la degradación de hidrocarburos aromáticos (Quentmeir y Friedrich, 1994). Respecto a los microorganismos alcalófilos, se sabe que producen una serie de enzimas extracelulares interesantes desde el punto de vista industrial, pero la información sobre su capacidad de degradar hidrocarburos es limitada (Kanekar, 1999).

### Salinidad

Hay una relación inversa entre salinidad y biodegradación de hidrocarburos de petróleo (Ward and Brock, 1978). Se ha visto, que a concentraciones salinas superiores al 2,4% (p/v) de NaCl, el efecto inhibitor es mayor para la degradación de fracciones aromáticas y polares que para la fracción saturada (Mille et al., 1991). No obstante, se conocen microorganismos capaces de oxidar hidrocarburos a una concentración salina del 30% (p/v) de NaCl (Kuznetsov et al., 1992; Kulichevskaya et al., 1992).

### Presión

Contaminantes con densidades mayores a la del agua de mar pueden hundirse hasta llegar al fondo marino, donde la presión hidrostática es elevada. La combinación de presión elevada y baja temperatura en el océano profundo provoca una baja actividad microbiana (Alexander, 1999). Por ejemplo, la tasa de biodegradación de un consorcio aislado del fondo marino era unas 10 veces inferior bajo condiciones de océano profundo que a presión ambiental (Schwarz et al., 1975).

### Oxígeno

La eficiencia de los procesos de biodegradación aeróbicos dependerá de la temperatura, ya que la solubilidad del oxígeno depende de ésta. Los pasos iniciales del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por parte de bacterias u hongos implican la oxidación del sustrato mediante oxigenasas, que requieren oxígeno molecular. Normalmente, no existen condiciones limitantes en la superficie de la columna de agua o en las capas superficiales de los ecosistemas bentónicos marinos. Sin embargo, con la profundidad, el sistema se vuelve anóxico. Tradicionalmente, se ha considerado que la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos tiene lugar a tasas despreciables, y que, por lo tanto, la importancia ecológica es limitada. No obstante, posteriores investigaciones han puesto de manifiesto la trascendencia de las rutas catabólicas anaeróbicas en la biorremediación (Harayama et al., 2004; Van Hamme et al., 2003).

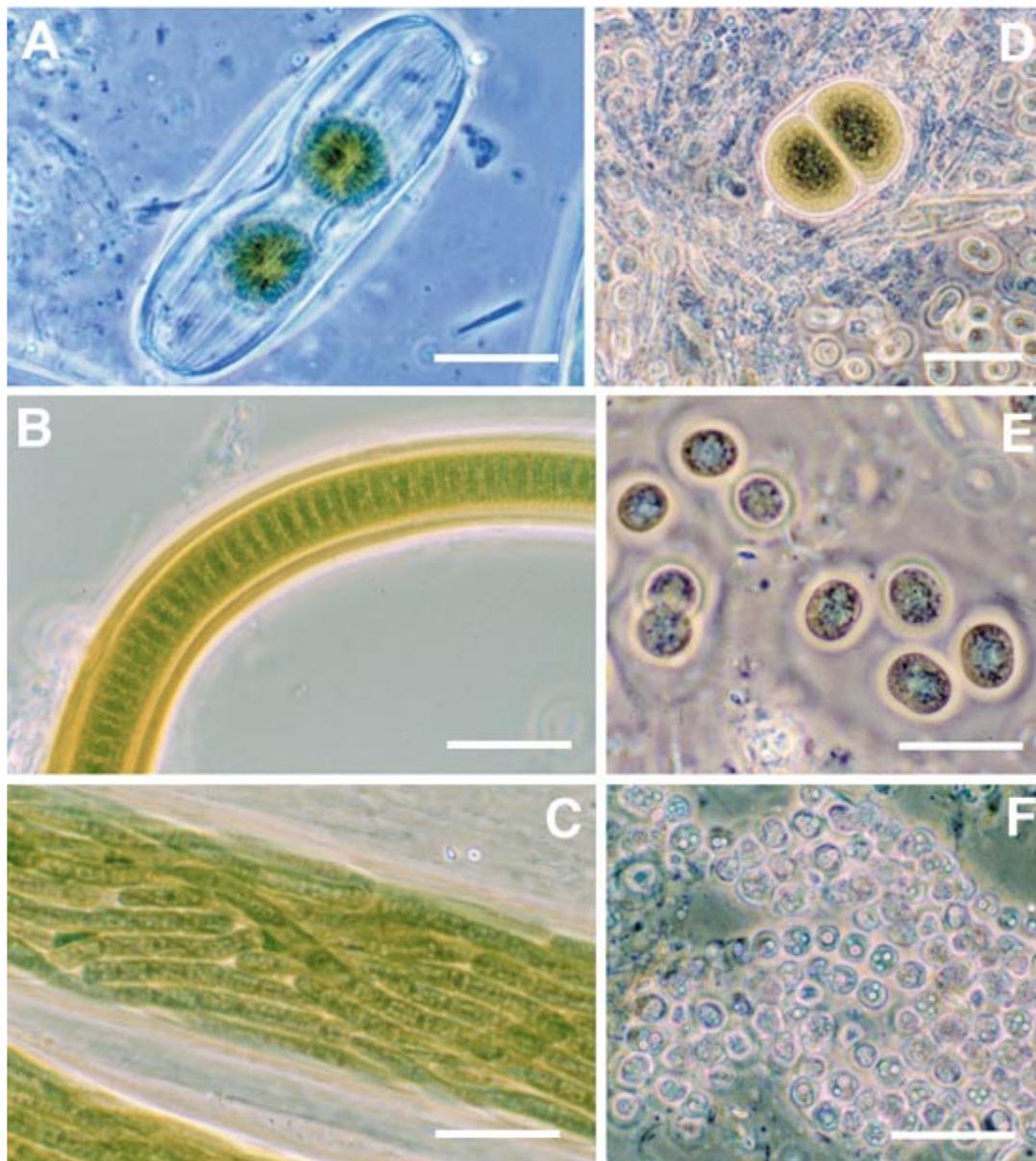
### Nutrientes

Cuando hay un vertido de petróleo en ambientes que presentan una baja concentración de nutrientes inorgánicos se suelen producir elevados cocientes C:N y/o C:P, los cuales son desfavorables para el crecimiento microbiano. Es bien conocido que la disponibilidad de N y P limita la degradación microbiana de hidrocarburos. De esta manera, el ajuste de estas proporciones mediante la adición de los nutrientes en forma de fertilizantes oleofílicos estimulará la biodegradación (Swannell et al., 1996).

El conocimiento de las condiciones ambientales que caracterizan el ecosistema que ha sido contaminado es un paso imprescindible a la hora de diseñar una estrategia de biorremediación que permita recuperar la zona afectada por el vertido con éxito. No se tiene un profundo conocimiento sobre los microorganismos degradadores de hidrocarburos y los procesos biológicos que están involucrados en la recuperación de los ambientes marinos contaminados. No obstante, se han utilizado diversos métodos, como por ejemplo la adición de nutrientes para estimular las poblaciones microbianas naturales capaces de degradar hidrocarburos, o la bioaugmentación o introducción de microorganismos o agrupaciones de éstos, los cuales han supuesto un incremento de la velocidad de biodegradación. En cualquier caso, la evaluación de la eficiencia de las diversas aproximaciones de biorremediación ha puesto de manifiesto la importancia de los microorganismos degradadores indígenas, ya que estos se han mostrado más efectivos que los degradadores inoculados (Radwan et al., 1995; 2000; Margesin y Shinner, 1997).

## Sistema bentónicos estratificados

Los tapetes microbianos son unos ecosistemas naturales donde microorganismos pertenecientes a diferentes grupos fisiológicos se agrupan en unos pocos milímetros de espesor. En ellos pueden establecerse complejas comunidades microbianas que se estratifican en profundidad, dependiendo de los abruptos gradientes de luz, oxígeno, sulfhídrico y potencial redox que se generan, y de su propia fisiología; de manera que a nivel macroscópico, pueden observarse una serie de laminaciones de diferentes colores en función de la composición taxonómica que presentan (Cohen et al., 1984; Cohen y Rosenberg, 1989; Stahl y Caumette, 1994). Las capas superficiales consisten en poblaciones fototróficas oxigénicas, de cianobacterias y algas eucariotas, principalmente (**Fig. 2 A, B, C, D, E**). En dichas laminaciones las bacterias heterotróficas consumen materia orgánica y oxígeno. Por debajo de éstas, si las condiciones son adecuadas, se sitúan las capas anaeróbicas dominadas por bacterias anaeróbicas fototróficas (**Fig. 2 F**) y heterotróficas.



**Figura 2.** Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases que muestran microorganismos fototróficos característicos de los tapetes microbianos del Delta del Ebro.

**A.** *Amphora eggregia*. **B.** *Lyngbya aestuarii*. **C.** *Microcoleus chthonoplastes*. **D.** *Chroococcus* sp. un miembro del grupo *Gloeocapsa*. **E.** *Aphanothece* sp. un miembro del grupo *Cyanothece*. **F.** Una nueva bacteria roja del azufre. (A, B, C, E y F, Barra=25  $\mu$ m; D, Barra=50 $\mu$ m).

Este tipo de comunidades, debido a su estructura física, son capaces de soportar perturbaciones tales como un episodio de contaminación ocasionado por un vertido de petróleo. Tanto es así que, numerosos estudios han puesto de manifiesto que los tapetes microbianos no sólo se desarrollan en ambientes marinos no contaminados; sino que también se encuentran en lugares sujetos a una contaminación crónica.

La idea de utilizar los tapetes microbianos para la biorrecuperación de las zonas litorales contaminadas surgió a raíz de diversas observaciones realizadas durante la guerra del Golfo en 1991. Dichos ecosistemas rápidamente cubrieron extensas áreas severamente contaminadas con petróleo y en pocos meses se observó la degradación de hidrocarburos, tanto aeróbica como anaeróbicamente. Diferentes investigaciones hablan de la degradación de hidrocarburos por las cianobacterias (Raghukumar et al., 2001). Además, se ha visto que tapetes microbianos localizados en zonas litorales contaminadas tienen la capacidad de degradar petróleo, aunque no se han identificado las poblaciones responsables de la metabolización de los compuestos de petróleo (Abed et al., 2002; Grötzschel et al. 2002). No hay duda de que las cianobacterias tienen un papel crucial en los tapetes, ya que son los responsables del establecimiento de los gradientes de oxígeno y de la síntesis de materia orgánica que utilizan las bacterias heterotróficas. De todas maneras, no está claro si son las cianobacterias o las bacterias heterotróficas las responsables directas de la biodegradación de los componentes del petróleo. Diversas investigaciones postulan que las cianobacterias tienen la capacidad de oxidar hidrocarburos. Al-Hasan y colaboradores (1998) mostraron que cultivos no axénicos de *Microcoleus chthonoplastes* y *Phormidium corium* aislados a partir de sedimentos contaminados del Golfo de Arabia eran capaces de degradar *n*-alcanos. Estudios en *Oscillatoria* sp. y *Agmenellum quadruplicatum* demostraron su capacidad de oxidar naftaleno (Cerniglia et al., 1979, 1980). Además, hay otros trabajos que muestran la capacidad de muchas otras cepas de degradar diversos componentes del petróleo (Yan et al., 1998, Radwan y Al-Hasan, 2000, Raghukumar et al., 2001; Mansy y El-Bestway, 2002). Sin embargo, en la mayor parte de estudios realizados con cianobacterias no está claro si los cultivos utilizados son axénicos. En este sentido, se han realizado diversas investigaciones donde las bacterias heterotróficas asociadas a las cianobacterias son las responsables de la biodegradación. Estos autores postulan que las cianobacterias por sí mismas no serían las responsables directas de la degradación de los componentes del petróleo, pero probablemente juegan un papel esencial indirecto soportando el crecimiento y la actividad de los verdaderos degradadores (Abed et al., 2005; Sorkhoh et al., 1995).

De todo lo expuesto se deduce el interés de estudiar la diversidad de los microorganismos indígenas de los tapetes microbianos, tanto para determinar el impacto de un episodio de contaminación sobre las comunidades naturales, como para identificar los organismos que juegan un papel clave en los procesos de biodegradación. La utilización del medio ambiente como laboratorio es demasiado costoso en términos ecológicos. Así pues, es necesario diseñar sistemas modelo en el laboratorio, tipo microcosmos, que mimeticen las condiciones ambientales del ecosistema natural y permitan evaluar el efecto de los contaminantes (Pritchard y Bourquin, 1984).

### **Aproximación experimental: microcosmos**

Los microcosmos utilizados en los experimentos de laboratorio son modelos miniaturizados con múltiples componentes, que permiten comprender las relaciones que se establecen entre las poblaciones microbianas, así como la función de éstas en el ecosistema cuando tiene lugar un episodio de contaminación (**Fig. 3**). Estos sistemas, además de los resultados cualitativos, permiten obtener resultados cuantitativos respecto al comportamiento del contaminante en el medio.

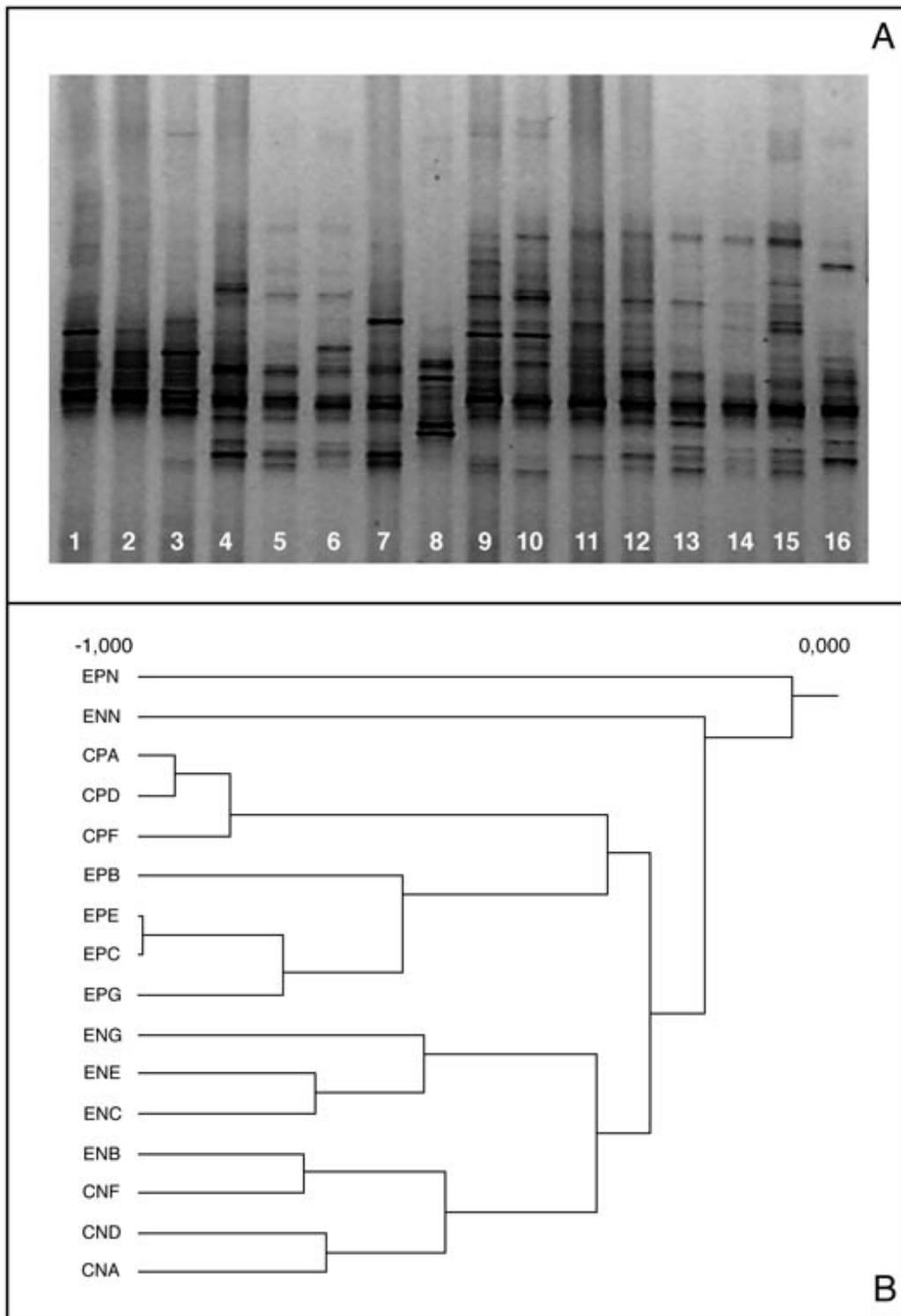


**Figura 3.** Microcosmos preparados a partir de los tapetes microbianos del Delta del Ebro. Fotografía cortesía de Marc Llíros.

Un aspecto clave a la hora de considerar si los datos obtenidos a partir del modelo experimental pueden extrapolarse a un suceso real, es el grado de fidelidad con el que cada modelo experimental reproduce el ecosistema original. En este sentido, en los tapetes microbianos se han realizado exhaustivos trabajos que presentan una descripción cualitativa y cuantitativa de este tipo de comunidades, cuya formación ha sido inducida en el laboratorio, en los cuales se concluye que tanto la estructura básica como los principales componentes de la biota no se alteran significativamente (Fenchel, 1998a, 1998b, Fenchel y Kühl, 2000; Kühl y Fenchel, 2000).

Además, a la hora de diseñar un experimento utilizando microcosmos, es importante incluir controles apropiados para separar la biodegradación real de diferentes procesos abióticos tales como la evaporación de los hidrocarburos, la lixiviación o la alteración fotoquímica que pueden ser responsables de la desaparición de una cantidad importante de diversos hidrocarburos.

Para demostrar la utilidad potencial de una técnica de biorremediación, un aspecto importante es documentar la degradación del contaminante en condiciones controladas de laboratorio. Además de comprobar la eficacia del tratamiento, también es muy importante ver que éste no tiene efectos colaterales adversos sobre el ecosistema. Los parámetros comúnmente analizados para evaluar la respuesta de los microorganismos frente a una contaminación por petróleo son los recuentos de microorganismos, ya sea mediante la técnica del número más probable (MPN), mediante microscopía de fluorescencia o a través del recuento de microorganismos degradadores de hidrocarburos capaces de crecer en placas de medio selectivo, la medida de la respiración microbiana (consumo de oxígeno o producción de dióxido de carbono) y la determinación de la velocidad de degradación en comparación con los controles no tratados. Estas técnicas, a excepción de los recuentos directos al microscopio, están limitadas por los problemas asociados a los microorganismos no cultivables, haciéndolas inadecuadas para evaluar la estructura de la comunidad de los ambientes afectados. Por lo tanto, la realización de un estudio fiable requiere el uso de métodos de biología molecular. Dentro de éstos, una de las metodologías más utilizadas para detectar alteraciones de la estructura microbiana de la comunidad es la DGGE (Muyzer et al., 1993). Dicha técnica permite separar fragmentos del DNA en función de su secuencia. Así, por ejemplo, tras la amplificación de los fragmentos del gen del rRNA 16S y la realización del gel de DGGE, se obtiene un perfil de bandas característico que constituye la huella genética de la comunidad (**Fig. 4A**). Los perfiles que se obtienen de las diferentes muestras pueden compararse considerando cada banda como un carácter que puede estar presente (1) o ausente (0); de manera que, a partir de estos datos, se puede obtener la matriz de disimilitud. Finalmente, se puede utilizar un método de agrupación jerárquico *unweighted pair-group method* (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973), basado en las distancias euclídeas, que permite agrupar las muestras según el grado de similitud y obtener un dendrograma como el que se muestra en la **Figura 4B**, el cual ha sido elaborado a partir de los perfiles de bandas que se muestran en la misma figura y forma parte de un estudio realizado con el propósito de analizar los cambios de diversidad asociados a la transformación de petróleo en microcosmos preparados a partir de tapetes microbianos del Delta del Ebro (Martínez-Alonso et al., 2004).



**Figura 4. A.** Perfiles de DGGE correspondientes a los productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación de fragmentos del rRNA 16S con cebadores específicos para cianobacterias (carril 1, CPA, carril 2, CPD, carril 3, CPF, carril 4, EPB, carril 5, EPC, carril 6, EPE, carril 7, EPG, carril 8, EPN, carril 9, CNA, carril 10, CND, carril 11, CNF, carril 12, ENB, carril 13, ENC, carril 14, ENE, carril 15, ENG, y carril 16, ENN). **B.** Dendrograma realizado a partir del análisis de las bandas que aparecen en el gel anterior.

El código de tres letras identifica la muestra. La primera letra corresponde al control (C) o al experimento (E); la segunda letra indica zona pigmentada (P) o sedimento negro (N), y la tercera letra es la secuencia en el tiempo.

Existen numerosos trabajos sobre biodegradación de hidrocarburos realizados en microcosmos (Bachoon et al., 2001; Evans et al., 2004). Sin embargo, cuando estos estudios se realizan en tapetes microbianos dicho número se ve enormemente reducido. Respecto al diseño de estos sistemas modelo, en la bibliografía hay descritas diversas maneras de prepararlos a partir de una muestra recogida del ecosistema natural mínimamente perturbada. Incluso se han diseñado sistemas experimentales especialmente apropiados para el estudio de sedimentos contaminados con petróleo (Musat et al., 2004).

En el año 2001 nuestro grupo de investigación se involucró en un proyecto europeo multidisciplinario, MATBIOPOL, cuyo propósito era evaluar el potencial biorremediador de los tapetes microbianos sujetos a una contaminación con petróleo. Uno de los objetivos de dicho proyecto era desarrollar sistemas modelo de los tapetes microbianos en el laboratorio que permitieran el estudio del efecto y la respuesta de este tipo de ecosistema a un vertido de petróleo. Las conclusiones más destacadas obtenidas por los distintos grupos de investigación que integraban este proyecto se detallan a continuación. En primer lugar, los tapetes microbianos desarrollados en el laboratorio muestran un comportamiento similar al observado en el ambiente natural ya que, cuando son cubiertos con petróleo, reaccionan, de manera que a las pocas semanas recubren la película de crudo. Las cianobacterias filamentosas migran hasta la superficie y llegan a constituir una nueva capa bacteriana sobre el petróleo. El petróleo queda atrapado en el tapete entre una capa óxica por encima y una anóxica por debajo, originándose una situación favorable para la biodegradación (Martínez-Alonso et al., 2004). Tras el contacto con el petróleo se observa un cambio de su estructura comparada con la perteneciente a los no contaminados. Las cianobacterias producen exopolisacáridos que forman una matriz que emulsiona el petróleo y permite el desarrollo de la comunidad degradadora de petróleo. Las bacterias aeróbicas son más activas en la matriz por la accesibilidad a los hidrocarburos y por la elevada producción de oxígeno por parte de las cianobacterias (Benthien et al., 2004). Respecto a las bacterias fototróficas, está claro que las cianobacterias son los elementos estructurales más importantes de los tapetes, pero su papel en el ataque de los hidrocarburos todavía no está claro (Cohen, 2002). Con referencia a las bacterias heterótrofas, varios grupos bacterianos son seleccionados tras la contaminación, principalmente el género aeróbico *Marinobacter* y algunas bacterias reductoras de sulfato (Bonin et al., 2004; McGowan et al., 2004).

En los tapetes microbianos, la degradación biológica de los componentes del petróleo bajo condiciones anóxicas es lenta y, presumiblemente, altamente selectiva (Bonin et al., 2004; Goréguès et al., 2004). En las capas anóxicas, bajo el petróleo, las bacterias reductoras de sulfato son más eficientes cuando coexisten con las bacterias rojas del azufre, para una mejor, aunque todavía lenta biodegradación (Ranchou-Peyruse et al., 2004).

Las interacciones entre las bacterias aerobias y anaerobias en la interfase óxica-anóxica hace que la biodegradación sea más eficiente, pero todavía no completamente bien entendida. Diversas moléculas pueden ser degradadas eficientemente (alcanos lineales y ramificados, compuestos poliaromáticos). Estas moléculas pueden ser biodegradadas de manera aeróbica por bacterias del género *Marinobacter* (McGowan et al., 2004), y anaeróbicamente mediante bacterias desnitrificantes o reductoras de sulfato (Bonin et al., 2004; Goréguès et al., 2004).

En resumen, los estudios realizados en el marco de este proyecto ponen de manifiesto la eficiencia de los microcosmos para valorar el impacto de un episodio de contaminación con petróleo sobre los tapetes microbianos, a la vez que muestran la importancia que pueden tener estos ecosistemas para una buena recuperación de las zonas litorales que sufren una contaminación crónica o puntual.

## Referencias

- Abed, R.M., Safi, N.M., Koster, J., de Beer D., El-Nahhal, Y., Rullkotter, J. y García-Pichel, F. 2002. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl Environ Microbiol* 68: 1674-1683.
- Abed, R.M.M. y Köster, J. 2005. The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *Int Biodeterior Biodegrad* 55: 29-37.
- Alexander, M. 1999. *Biodegradation and bioremediation*. 2nd Ed. Academic Press, London.
- Al-Hasan, R.H., Al-Bader, D.A., Sorkhoh, N.A. y Radwan, S.S. 1998. Evidence for *n*-alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. *Mar Biol* 130: 521-527.
- Amann, R.L., Ludwig, W. y Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 51: 143-169.

- Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* 45: 180-209.
- Bachoon, D.S., Hodson, R.E. y Araujo, R. 2001. Microbial community assessment in oil-impacted salt marsh sediment microcosms by traditional and nucleic acid-based indices. *J Microbiol Methods* 46: 37-49.
- Benthien, M., Wieland, A., García de Oteyza, T., Grimalt, J.O., y Kühl, M. 2004. Oil contamination effects on a hypersaline microbial mat community (Camargue, France) as studied with microsensors and geochemical analysis. *Ophelia* 58: 135-150.
- Bonin, P., Cravo-Laureau, C., Michotey, V. y Hirschler-Réa, A. 2004. The anaerobic hydrocarbon biodegrading bacteria: an overview. *Ophelia* 58: 243-254.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T. y Baalen, C.V. 1979. Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphtol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 88: 50-58.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T. y Baalen, C.V. 1980. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *Journal of General Microbiology* 116: 495-500.
- Chen, C.I. y Taylor, R.T. 1995. Thermophilic biodegradation of BTEX by two *Thermus* species. *Biotechnol Bioeng* 48: 614-624.
- Chen, C.I. y Taylor, R.T. 1997a. Batch and fed-batch bioreactor cultivations of a *Thermus* species with thermophilic BTEX-degrading activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 726-733.
- Chen, C.I. y Taylor, R.T. 1997b. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 121-128.
- Cohen, Y y Rosenberg, E. 1989. *Microbial mats: Physiological ecology of benthic microbial communities*. ASM editions, Washington DC, USA.
- Cohen, Y. 2002. Biorremediation of oil by marine microbial mats. *Int Microbiol* 5: 189-193.
- Cohen, Y., Castenholz, R.W. y Halvorson, H.O. 1984. *Microbial mats: stromatolites*. Alan R. Liss, Inc., N.Y., USA.
- Colwell, R.R. y Walker, R.D. 1977. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit Rev Microbiol* 5: 423-445.
- Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C. y Staley, J.T. 1995. *Cycloclasticus pugetii* gen. Nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int J Syst Bacteriol* 45: 116-123.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glockner, F.O. and Amann, R. 2000. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl Environ Microbiol* 66: 3044-3051.
- Engelhardt, M.A., Daly, k., Swannell, R.P. y Head, I.M. 2001. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *J Appl Microbiol* 237-247.
- Evans, F.F., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Casella, R., Machado, P.L.O.A., Holmström, C., Kjelleberg, S., van Elsas, J.D. y Seldin L. 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* 49: 295-305.
- Fenchel, T. 1998a. Artificial cyanobacterial mats: structure and composition of the biota. *Aquat Microb Ecol* 14: 241-251.
- Fenchel, T. 1998b. Artificial cyanobacterial mats: cycling of C, O and S. *Aquat Microb Ecol* 14: 253-259.
- Fenchel, T. y Kühl, M. 2000. Artificial cyanobacterial mats: growth, structure, and vertical zonation patterns. *Microb Ecol* 40: 85-93.
- Foght, J., Semple, K., Gauthier, C., Westlake, D.K.S., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Wang, Z y Fingas, M. 1999. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions.

*Environ Technol* 20: 839-849.

Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernández, L., Acquaviva, M., Bonin, P. y Bertrand, J.C. 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. Nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 42: 568-576.

Gilewicz, M., Ni?matuzahroh, T., Nadalig, H., Budzinski, P., Doumenq, V., Michotey, J.C. y Bertrand, J.C. 1997. Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 528-533.

Golyshin, P.N., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N. y Yakimov, M.M. 2002. *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligatorily utilizes hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 901-911.

Goréguès, C., Michotey, V. y Bonin, P. 2004. Isolation of hydrocarbonoclastic denitrifying bacteria from Berre microbial mats. *Ophelia* 58: 263-270.

Grötzschel, S., Köster, J., Abed, R.M.M. y de Beer, D. 2002. Degradation of petroleum compounds immobilized on clay by a hypersaline mat. *Biodegradation* 13: 273-283.

Harayama, S., Kasai, Y. y Hara, A. 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol* 15: 205-214.

Kanally, R.A., Bartha, R. Watanabe, K. y Harayama, S. 2000. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4205-4211.

Kanekar, P.P., Sarnaik, S.S. y Kelkar A.S. 1999. Bioremediation of phenol by alkaliphilic bacteria isolated from alkaline lake of Lonar, India. *J Appl Microbiol* 85: 128S-133S.

Korda, A., Santas, P., Tenente, A. y Santas, R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, *in situ* treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 677-686.

Kühl, M. y Fenchel, T. 2000. Bio-optical characteristics and vertical distribution of photosynthetic pigments and photosynthesis in an artificial cyanobacterial mat. *Microb Ecol* 40: [\[U1\]](#) ??-??.

Kulichevskaya, I.S., Milekhina, E.I., Borzenkov, I.A., Zvyagintseva, I.S. y Belyaev SS. 1992. Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiology* 60: 596-601.

Kuznetsov, V.D., Zaitseva, T.A., Vakulenko, L.V. y Filippova, S.N. 1992. *Streptomyces albiacialis* sp. nov.: a new petroleum hydrocarbon-degrading species of thermo- and halotolerant Streptomyces. *Microbiology* 61: 62-67.

Leahy, J.G. y Colwell, R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* 54: 305-315.

MacCormack, W.P. y Fraile, E. 1997. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrophilic Antarctic bacterium. *Antarctic Sci* 9: 150-155.

Macnaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis G.A., Chang Y.-J. y White, D.C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol* 65: 3566-3574.

Mansy, A.E. y El-Bestway, E. 2002. Toxicity and biodegradation of fluometuron by selected cyanobacterial species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 125-131.

Margesin, R. y Schinner, F. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Appl Environ Microbiol* 63: 2660-2664.

Margesin, R. y Schinner, F. 1999. Biological decontamination of oil spills in cold environments. *J Chem Technol Biotechnol* 74: 381-389.

Martínez-Alonso, M., García de Oteyza, T., Llíros, M., Munill, X., Muyzer, G., Esteve, I., Grimalt, J.O. y Gaju, N. 2004. Diversity shifts and crude oil transformation in polluted microbial mat microcosms. *Ophelia* 58: 205-216.

- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D. y Stackebrandt, E. 2002. Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. *Syst Appl Microbiol* 25: 450-455.
- McGowan, L., Herbert, R. y Muyzer, G. 2004. A comparative study of hydrocarbon degradation by *Marinobacter* sp., *Rhodococcus* sp. and *Corynebacterium* sp. isolated from different mat systems. *Ophelia* 58: 271-282.
- Mille, G., Almallah, M., Bianchi, M., Wambeke, F. van y Bertrand, J.C. 1991. Effect of salinity on petroleum biodegradation. *Fresenius J Anal Chem* 339: 788-791.
- Müller, R., Antranikian, G., Maloney, S. y Sharp, R. 1998. Thermophilic degradation of environmental pollutants. En *Advances in Biochemical Engineering/Bio-technology*, vol 61 (ed. Antranikian, G.), pp.155-169, Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Musat, F., Wieland, A. y Widdel, F. 2004. Marine sediment with surface contamination by oil in microcosms for microbiological studies. *Ophelia* 58: 217- 222.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. y Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Olsen, G.J., Lane, D.L., Giovannoni, S.J. y Pace, N.R. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* 40: 337-365.
- Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.L. y Olsen G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences. *Adv Microbiol Ecol* 9: 1-55.
- Pritchard, O.H. y Bourquin, A.W. 1984. The use of microorganisms for evaluation of interactions between pollutants and microorganisms. *Advances in Microbial Ecology* 7: 133-215.
- Quentmeier, A. y Friedrich, C.G. 1994. Transfer and expression of degradative and antibiotic resistance plasmids in acidophilic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 60:973-978.
- Radwan, S.S. y Al-Hasan, R.H. 2000. Oil pollution and cyanobacteria En *The ecology of cyanobacteria* (eds. Whitton, B.A. y Potts, M.), pp. 307-319, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Radwan, S.S., Al.Mailem, D., El-Nemr, I. y Salamah, S. 2000. Enhanced remediation of hydrocarbon contaminated desert soil fertilized with organic carbons. *Int Biodeterior Biodegrad* 46: 129-132.
- Radwan, S.S., Sorkhoh, N.A., Fardoun, F. y Al-Hasan, R.H. 1995. Soil management enhancing hydrocarbon degradation in the polluted Kuwaitii desert. *Appl Microbiol Biotechnol* 44: 265-270.
- Raghukumar, C., Vipparthy, V., David, J.J. y Chandramohan, D. 2001. Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 433-436.
- Ranchou-Peyruse, A., Moppert, X., Hourcade, E., Hernández, G., Caumette, P. y Guyoneaud, R. 2004. Characterization of brackish anaerobic bacteria involved in hydrocarbon degradation: a combination of molecular and culture-based approaches. *Ophelia* 58: 255- 262.
- Rios-Hernández, L.A., Gieg, L.M. y Suflita, J.M. 2003. Biodegradation of an alicyclic hydrocarbon by a sulfate-reducing enrichment from a gas condensate-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1): 434-443.
- Schwarz, J.R., Walker, J.D. y Colwell, R.R. 1975. Deep-sea bacteria: growth and utilization of *n*-hexadecane at *in situ* temperature and pressure. *Can J Microbiol* 21: 682-687.
- Siron, R., Pelletier, E. y Brochu C. 1995. Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold seawater. *Arch Environ Contam Toxicol* 28: 406-416.
- Sneath, P. y Sokal, R. 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Sorkhoh, N.A., Al-Hasan, R.H., Khanafer, M. y Radwan, S.S. 1995. Establishment of oil-degrading bacteria associated with

cyanobacteria in oil-polluted soil. *Journal of Applied Bacteriology* 78: 194-199.

Stal, L.J. y Caumette, P. 1994. *Microbial mats: structure, development and environmental significance*. NATO ASI Series, 35, Springer-Verlag, Berlin, 463 pp.

Suzuki, M.T., Rappé, M.S., Haimberger, Z.Q., Winfield, H., Adair, N., Ströbel, J. y Giovannoni, S.J. 1997. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Appl Environ Microbiol* 63: 983-989.

Swannell, R.P.J., Lee, K. y McDonagh, M. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol Rev* 60: 342-365.

Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.A. y Ovreas, L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol* 64: 53-62.

Van Hamme, J.D., Singh, A. y Ward O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 503-549.

Ward, D.M. y Brock, T.D. 1978. Hydrocarbon degradation in hypersaline environments. *Appl Environ Microbiol* 35: 353-359.

Watanabe, K. 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 12: 237-241.

Whyte, L.G., Greer, C.W. y Inniss, W.E. 1996. Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. *Can J Microbiol* 42: 99-106.

Whyte, L.G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonnière, L., Inniss, W.E. y Greer, C.W. 1998. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl Environ Microbiol* 64: 2578-2584.

Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N. y Golyshin, P.N. 2003. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 779-785.

Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R., Abraham, W.R., Lunsdorf, H. y Timmis, K.N. 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. Nov., sp. nov., a new hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst. Bacteriol* 48: 339-348.

Yan, G.A., Jiang, J.W., Wu, G. y Yan, X. 1998. Disappearance of linear alkylbenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* sp. HB 1017. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 329-334.

Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M. y Tay, S.T. 2003. Isolation of naphthalene-degrading bacteria from tropical marine sediments. *Water Sci Technol* 47: 303-308.

ZoBell, C.E. 1946. Actions of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol Rev.* 10: 1-49.